动 物 学 研 究 1994, 15 (3): 39—44 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

树鼠 mtDNA 限制性内切酶图谱及其与小家鼠褐家鼠的亲缘关系

兰 宏 陈志平 王应祥 施立明
(中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)

A **摘要** 本实验用 *Apa* Ⅰ，*Ava* Ⅰ，*Bam* HⅠ、*Bcl* Ⅰ，*Bgl* Ⅰ、*Cla* Ⅰ，*Eco* RⅠ，*Eco* RV，*Hpa* Ⅰ，*Pst* Ⅰ，*Pvu* Ⅱ，*Sca* Ⅰ、*Xba* Ⅰ等 13 种限制性内切酶分析树鼠(*Chiromyscus chiropus*) 的 mtDNA 限制性片段长度多态性，并用双酶解法构建了其中 8 种酶的限制性内切酶图谱。根据限制性片段差异法和分子钟，计算并讨论树鼠和小家鼠(*Mus musculus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)的 mtDNA 遗传距离和亲缘关系。结果表明树鼠与褐家鼠的关系较接近，两者的分歧时间在距今 1500—2000 万年前，即处于中新世早中期。

关键词 树鼠，mtDNA 线粒体；DNA；褐家鼠；小家鼠

高等动物线粒体 DNA (mitochondrial DNA，mtDNA)是共价闭合的双链 DNA，分子大小为 16.5 kb 左右。mtDNA 基因组织结构简单、稳定，且遵循母系遗传方式，在遗传过程中不发生重组(Brown，1983)。利用限制性内切酶处理 mtDNA，得到的限制性片段长度多态(RFLP)或限制性内切酶图谱既具有相对的种属稳定性，又能够反映种属间的进化关系，因而成为动物种属鉴定和系统演化研究的一种有效的遗传标记。

树鼠(*Chiromyscus chiropus*)是一种非常珍贵的树栖鼠类，在分类学上属于鼠科(Muridae)，鼠亚科(Murinae)，是树鼠属(*Chiromyscus*) 中唯一的种。国外分布于缅甸东部、泰国北部、越南和老挝等地(Musser，1981；Corbet 等，1992)。1993 年 6 月，中国科学院昆明动物研究所从云南西双版纳勐腊获得两只活体树鼠，是中国的新记录(王应祥等，另文发表)。

树鼠类极难获得标本，非常珍贵，因此关于它们的系统发育关系的研究甚少，微观方面的研究几乎没有开展。我们利用昆明动物研究所获得活体标本这一难得的机会，构建了树鼠的 mtDNA 限制性内切酶图谱，并与现有的褐家鼠、小家鼠资料比较，探讨其间的系统演化关系。

1 材料和方法

1.1 动物来源

树鼠(*Chiromyscus chiropus*) 1♂，捕自云南省西双版纳州勐腊县。

本文 1993 年 10 月 9 日收到，同年 12 月 16 日修回

1.2 试剂

限制性内切酶购自华美生物技术公司；RNaseI 为德国 Boehringer Mannheim 公司产品；SDS 为 Servi 进口分装，用时重结晶；其他试剂均为国产分析纯。

1.3 mtDNA 提取和纯化

参照本实验室改进的方法(王文等，1993)进行。

1.4 限制性内切酶消化

各种限制性内切酶酶解缓冲液采用厂家的专用缓冲液，酶解溶液体积为 20 μl，内含 1 μg 左右的 mtDNA 和 4—8 单位限制酶，37℃消化 4—8 h 后，加入 1／5 体积的载样缓冲液(10 mmol／L Tris-HCl，0.2 mol／L EDTA，0.15%溴酚蓝，50%甘油，pH8.0)终止反应。

1.5 琼脂糖凝胶电泳

配制 1.0%的琼脂糖平板凝胶(20×30×0.5 cm)，用 Tris—硼酸电极缓冲液，2 V／cm 电压室温下电泳过夜。紫外灯下观察、拍照。用双酶解法构建限制性内切酶图谱。

1.6 亲缘关系分析

由于小家鼠(*Mus musculus*)和褐家鼠(*Rattus norvegicus*)的 mtDNA 全序列已测定(Bibb 等，1981，Gadaleta 等，1989)，因而我们可以推断这些限制性内切酶在它们的 mtDNA 上的切点位置，从而推算限制性片段的大小，据此分析树鼠和两者之间的亲缘关系。这一工作借助 Pharmacia 公司提供的 DNASIS 软件在 IBM-PC 386 微机上完成。

按 Nei 和 Li (1979)的公式：

$$F \approx (e^{-rP/2})^4 / (3-2e^{-rP/2})$$

相当于

$$P \approx 1-[(-F+(F^2+8F)^{1/2})/2]^{1/6}$$

$$F = 2n_{xy} / (n_x+n_y)$$

式中 P 为每一个位点的平均碱基置换度，代表物种间的遗传距离，F 为物种间的限制性片段共享度，n_x 和 n_y 分别为物种 x 和 y 的限制性片段数，n_{xy} 为两物种间相同的片段数。

根据限制性片段差异法计算各个物种间的遗传距离。利用 UPGMA 聚类分析法(Sokal 等，1973) 和 NJ 法 (Neighbor-Joining method) (Saito 等，1987) 构建这 3 种鼠的的分子聚类图，构树软件由日本 Saitama 肿瘤中心研究所 O. Gotoh 博士惠赠。

2 结果和讨论

树鼠 mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱如图 1 所示。树鼠 13 种酶限制性片段的分子量(kb)以及小家鼠、褐家鼠相关片段的分子量见表 1。

用双酶解法构建的树鼠 mtDNA 限制性内切酶图谱见图 2。尽管我们所用的 mtDNA 提取方法得率达到 1—2 μg／g 组织，但由于鼠类个体相对较小，获得的 DNA 量有限，我们只确定了其中 8 种酶切点间的相互关系。它们是：*Apa* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Bam* HⅠ、*Bgl* Ⅰ、*Cla* Ⅰ、*Hpa* Ⅰ、*Pst* Ⅰ和 *Pvu* Ⅱ。

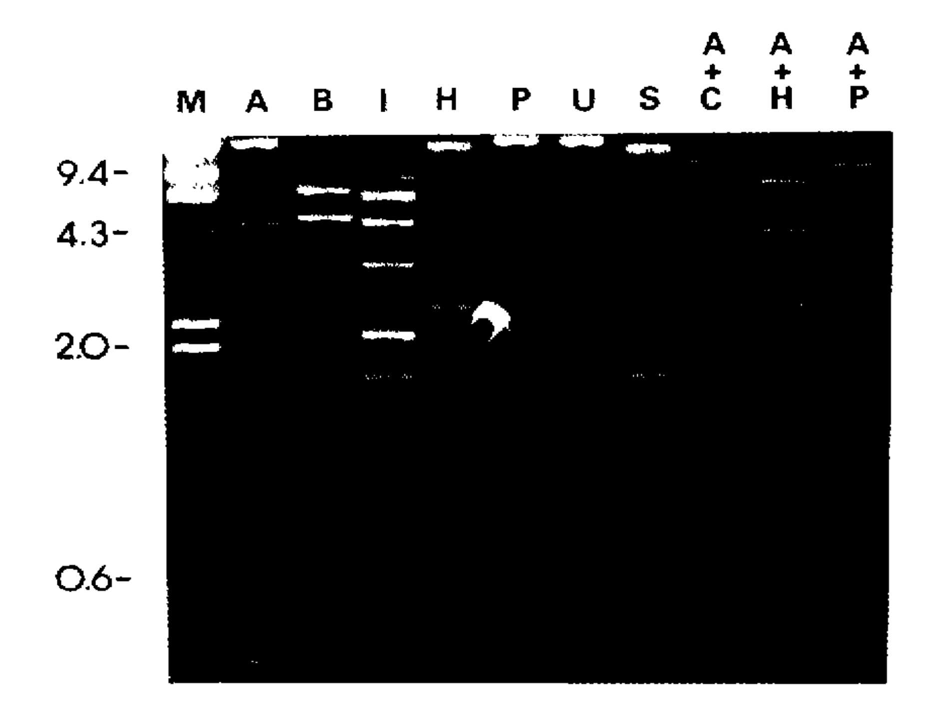


图 1　树鼠(*Chiromyscus chiropus*) mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱
Fig. 1　The electrophoresis patterns of mtDNA of the Fea's tree mouse digested with restriction endonuclease. The abbreviations of enzymes follows those in Table 1
限制性内切酶简称同表 1，M 为 λ DNA / HindⅢ分子量标记(kb)

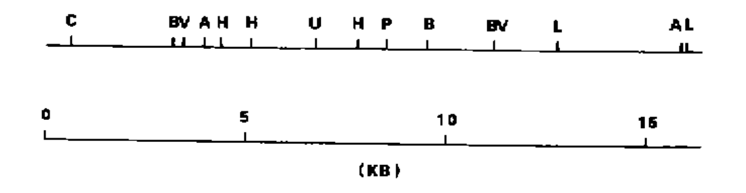


图 2　树鼠 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱(限制性内切酶简称同表 1)
Fig. 2　The restriction map of mtDNA from the Fea's tree mouse
(The abbreviations of enzymes follows Table 1)

反映 3 类鼠之间遗传进化关系的 UPG 和 NJ 聚类图见图 3，UPG 聚类图上的数值为 Nei 氏遗传距离。从图中可见，树鼠与褐家鼠之间的关系较近。遗传距离为 0.064，约为它们与小家鼠的遗传距离(0.125)的一半。已有的分子生物学资料(Parker 等，1977；Gadeleta 等，1989；Arnason 等，1991)都表明，小家鼠和褐家鼠的分歧时间在距今近 4000 万年以前，我们可以推测，树鼠与褐家鼠的分歧时间在距今 1500—2000 万年前，处于中新世早中期。应当指出的是，由于标本难得，本实验只分析了 1 只雄性树鼠，作亲缘关系分析时未能考虑到可能存在的个体差异问题。然而，根据以往的资料(Brown，1983)，mtDNA RFLP 的种内差异远小于种间差异，因此我们推测，树鼠的个体差异可

能会影响到上述分析的具体数值，但不会改变3种鼠之间的亲缘关系。

表1 树鼠(A)、小家鼠(B)和褐家鼠(C)mtDNA限制性片段分子量

Tab. 1 The molecular sizes of the restriction fragments of the mtDNA from the Fea's tree mouse (A), mouse(B) and rat (C)

限制酶	识别序列	物种	切点数	限制性片段分子量(kb)
Apa Ⅰ (A)	GGGCCC	A	2	11.9, 4.3
		B	3	11.9, 3.8, 0.5
		C	2	11.9, 4.3
Ava Ⅰ (V)	CYCCRG	A	2	8.2, 8.0
		B	2	13.8, 2.4
		C	3	8.9, 5.0, 2.4
Bam HⅠ (B)	GGATCC	A	3	8.3, 6.3, 1.7
		B	4	8.3, 6.9, 0.7, 0.4
		C	2	11.2, 5.1
Bcl Ⅰ (I)	TGATCA	A	5	6.1, 3.8, 2.3, 2.3, 1.8
		B	6	4.1, 4.1, 4.0, 2.5, 0.8, 0.7
		C	4	5.3, 4.4, 3.8, 2.8
Bgl Ⅰ (L)	GCCN5GGC	A	2	13.0, 3.3
		B	3	10.0, 3.3, 2.7
		C	2	13.0, 3.3
Cla Ⅰ (C)	ATCGAT	A	1	16.3
		B	2	11.4, 4.8
		C	1	16.3
Eco RⅠ (E)	GAATTC	A	7	4.3, 3.9, 2.4, 2.4, 2.1, 0.7, 0.5
		B	3	14.0, 2.1, 0.2
		C	7	6.2, 3.9, 3.0, 1.9, 0.7, 0.5, 0.1
Eco RV (R)	GATATC	A	3	7.8, 7.5, 1.0
		B	2	9.5, 6.8
		C	2	12.9, 3.4
Hpa Ⅰ (H)	GTTAAC	A	3	13.0, 2.6, 0.7
		B	3	10.4, 3.3, 2.6
		C	2	13.7, 2.6
Pst Ⅰ (P)	CTGCAG	A	1	16.3
		B	2	12.5, 3.8
		C	0	
Pvu Ⅱ (U)	CAGCTG	A	1	16.3
		B	3	12.9, 2.9, 0.5
		C	2	15.4, 0.9
Sca Ⅰ (S)	AGTACT	A	5	12.2, 1.7, 1.1, 0.8, 0.5
		B	3	9.1, 5.5, 1.7
		C	6	8.6, 3.6, 2.3, 1.3, 0.5, 0.1
Xba Ⅰ (X)	TCTAGA	A	3	7.2, 6.7, 2.4
		B	6	7.6, 5.1, 1.9, 0.9, 0.5, 0.3
		C	2	10.4, 5.9

注：小家鼠和褐家鼠的数据来自已经测定的mtDNA全序列(Bibb等，1981，Gadaleta等，1989)。

树鼠早期曾被认为归属于小鼠属(*Mus*)，Thomas (1925)把它从小鼠属中分立出来建立了树鼠属。近期研究认为，树鼠从头骨和牙齿结构来看，与白腹鼠属 (*Niviventer*) (抑或大鼠 *Rattus* 属中的1个亚属)特别是其中的 *N. cremoriventer* 和 *N. langbianis* 很相似，

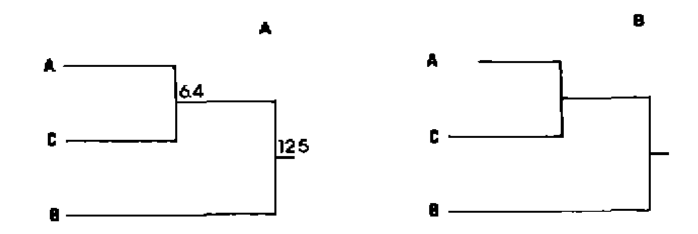


图 3　树鼠(A)、小家鼠(B)和褐家鼠(C) mtDNA 分子聚类图

Fig. 3　The mtDNA dendrograms of the Fea's tree mouse, the mouse and the rat

A: UPG, B: NJ

它们之间的区别在于树鼠主要是树栖，其趾端有指甲而不是爪，并有明显的眶上嵴(Musser, 1981)。我们的结果表明树鼠与褐家鼠的关系比与小家鼠的近 1 倍，与近期形态学研究的结果一致。我们还根据分子钟推测，树鼠与褐家鼠的分歧时间在距今 1500—2000 万年前，处于中新世早中期。这一结果可望作为形态进化研究的参考。

我们的结果尚属初步，今后我们将收集树鼠在形态学上的近缘属种(参见 Corbet 等, 1992)，如白腹鼠属(*Niviventer*)、王鼠属(*Maxomys*)、硕鼠属(*Berylmys*)、笔尾树鼠属(*Chiropodomys*)、攀鼠属(*Vandeleuria*)等，并增加外群物种的数量，来进一步研究树鼠以及鼠科各近缘属种之间的遗传进化关系。

参 考 文 献

王　文，施立明，1993. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法. 动物学研究，14(2): 197—198.

Arnason V *et al*, 1991. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the fin whale, *Balenoptera physalus*. *J. Mol. Evol.* **33**: 556-568.

Bibb M J *et al*, 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, **26**: 167-180.

Brown W N, 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei M, Koehml R K, Evolution of Genes and Proteins. New York: 62-68.

Corbet G B, Hill J E, 1992. The mammals of the indomalayan region. Natural History Museum Publications, Oxford University Press.

Gadaleta G *et al*, 1989. The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: erotic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J. Mol. Evol.*, **28**: 497-516.

Musser G G, 1981. Results of the Archbold Expeditions. No. 105. Notes on systematics of Indo-Malayan murid rodents, and description of new genera and species from Ceylon, Sulawesi, and the Philippines. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **168**(3): 316-318.

Parker R C, Watson R M, 1977. Restriction endonuclease cleavage maps of rat and mouse mitochondrial DNA. *Nuc. Acid. Res.*, **4**: 1291-1299.

Saito M, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, **40**: 406-425.

Sneath P H A, Sokal R R, 1973. Numercial Taxonomy. Freeman, San Francisco.

Thomas O, 1925. The mammals obtained by Mr. Herbert Stevens on the Sladen–Godman Expedition to Tonkin. *Proc. Zool. Soc. London.* 495–506.

THE MITOCHONDRIAL DNA RESTRICTION MAP OF THE FEA'S TREE MOUSE (*Chiromyscus chiropus*) AND ITS EVOLUTIONARY RELATIONSHIP WITH MOUSE AND RAT

Lan Hong Chen Zhiping Wang Yingxiang Shi Liming

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)

Abstract

In this paper 13 restriction endonucleases, *Apa* I, *Ava* I, *Bam* HI, *Bcl* I, *Bgl* I, *Cla* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hpa* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sca* I, *Xba* I, were used to analyse the mitochondrial DNA of the precious Fea's tree mouse. Restriction map of 8 enzymes was obtained by the double–digestion method. According to the RFLPs and molecular clock, the genetic relationship among the Fea's tree mouse, the mouse and the rat was estimated. The result show that the Fea's tree mouse is closer to the rat, and that the divergence time between them is $15-20\times10^6$ years.

Key words Mitochondrial DNA, Fea's tree mouse